

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷ C12Q 1/68	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10- 2004- 0078506 2004년09월10일
-------------------------------------------	------------------------	----------------------------------

(21) 출원번호	10- 2003- 0013464
(22) 출원일자	2003년03월04일

(71) 출원인	주식회사 바이오메드랩 서울 종로구 동숭동 1- 49 동숭빌딩
----------	--------------------------------------

(72) 발명자	윤성욱 서울특별시강남구도곡동547- 3문성빌딩501호
	김정미 서울특별시은평구불광1동미성아파트7동208호

(74) 대리인	유미특허법인
----------	--------

심사청구 : 있음

(54) 인유두종 바이러스의 감염을 진단하기 위한 유전형 분석프로브 및 이를 포함하는 바이오칩

요약

본 발명은 인유두종 바이러스의 DNA 또는 RNA에 결합하는 프로브, 이를 포함하는 DNA 칩을 사용하여 인유두종 바이러스의 감염 및 유전형을 진단하는 인유두종 바이러스의 감염여부를 진단할 수 있는 DNA 칩 및 유전형 분석키트에 관한 것이다.

대표도

도 1

색인어

인유두종 바이러스, 프로브, DNA 칩, 유전형 분석키트

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 일례에 따른 DNA 칩에 위치한 프로브의 종류와 위치를 나타내는 모식도이다.

도 2a는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV6 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2b는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV11 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2c는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV18 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2d는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV31 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2e는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV33 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2f는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV39 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2g는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV42 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2h는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV44 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2i는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV45 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2j는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV51 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2k는 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV52 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2l은 도 1에 나타낸 DNA 칩으로 HPV59 DNA를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[산업상 이용분야]

본 발명은 인유두종 바이러스의 감염을 진단하기 위한 유전형 분석 프로브 및 이를 포함하는 바이오칩에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 DNA 칩을 사용하여 인유두종 바이러스에 감염된 환자의 유전형을 분석하는 인유두종 바이러스의 유전형 분석키트 및 상기 분석키트를 사용하여 환자의 유전형을 분석함으로써, 인유두종 바이러스의 감염여부를 진단하는 방법에 관한 것이다.

[종래기술]

자궁암에는 자궁경부암, 자궁체부암, 자궁육종암 등이 있으나, 이중 자궁경부암의 경우는 매년 전세계적으로 약 45 만명, 우리나라의 경우 약 6,000명의 새로운 환자가 발생하고 있다. 자궁경부암은 한국 여성암의 22.1 %에 달하며(상피내암 포함), 발생률 1위, 사망률 2위를 차지하여, 자궁경부암의 예방, 진단 및 치료는 여성 보건에 있어서 중요한 문제로 여겨지고 있다.

자궁경부암은 자궁경부 상피내종양이라는 암 전단계를 걸쳐 진행되는데, 인유두종 바이러스(Human papillomavirus, HPV)의 감염이 자궁경부 종양의 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히, 특정 유전형(genotype)의 HPV에 감염된 경우에 종양으로 진행할 가능성은 더욱 높아지게 된다. 인유두종 바이러스가 자궁경부암의 주요원인으로 밝혀진 이후로 현재까지 HPV는 70여 가지의 유전형이 발견되었으며, 병소의 위치와 병변의 진행정도에 따라 각각 특이한 HPV 유전형이 선택적으로 발견되어, HPV 감염의 생물학적 특징의 다양성을 인식하게 되었다. 생식기 감염 HPV 유전형 중 10개 이상이 고위험군으로 분류되어 자궁경부암과 연관되는 것으로 알려져 있으므로, HPV 감염의 생물학적 특징의 다양성이 자궁경부암의 진단과 예방에 중요한 의미를 지닌다는 것을 암시하고 있다.

자궁경부암의 가장 간단한 조기진단법은 병리세포학적 검사인 자궁경부 세포진검사로서 자궁표면의 노화된 세포를 채집, 염색하여 상피세포 핵주위에 공동화(perinuclear halo)를 보이는 코일로사이토시스(koilocytosis) 등의 특징적인 병리소견으로 진단하는 방법인데, 그 진단율이 1 내지 15%로 낮고, 진단상 많은 제한이 있어, 이를 보완하기 위하여 질확대경진을 시행하여 HPV 감염을 70%까지 진단할 수 있으나, 장비가 고가이며, 고도로 숙련된 판독자가 필요하고, 악성화위험도가 다른 HPV 유전형을 분류할 수 없다는 단점이 있었다. 이에 따라 자궁경부암 전구 병변의 진단을 위한 선별검사 또는 자궁경부 세포진 검사의 보조적 수단으로서 HPV의 존재와 유전형을 확인하는 기법들에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있는 실정이다.

상기 HPV의 존재 및 유전형 확인 방법은 크게 HPV DNA의 직접확인법과 HPV DNA의 증폭을 이용하는 방법으로 나눌 수 있다. 상기 HPV DNA의 직접확인법으로는 리퀴드 하이브리다이제이션(liquid hybridization, Hybrid Capture by Digene Diagnostics, Silver Spring, MD), HPV 타입- 특이적 프로브(type- specific probe)를 이용한 서던블롯(S

outhern blot) 및 도트블롯(Dot blot), 필터 인 시튜 하이브리다이제이션(Filter in situ hybridization, FISH) 등이 있고, HPV DNA의 종족을 이용하는 방법으로는 타입- 특이적 PCR(type- specific polymerase chain reaction), 제너럴- 프라이머 PCR(general- primer PCR) 등이 있으며, 특히 제너럴 프라이머 세트(General primer set)를 이용하여 종족된 HPV DNA는 도트 블롯 하이브리다이제이션(dot blot hybridization), 마이크로티터 플레이트 하이브리다이제이션(microtiter plate hybridization), 또는 라인 프로브 어세이(line probe assay)등의 방법을 통해 유전형을 검색하는 방법이 일반적으로 수행되고 있다.

그러나, 니트로셀룰로소막(nitrocellulose membrane)에 올리고뉴클레오타이드 프로브를 고정하여 20 여 가지 타입을 검색하는 라인 프로브 어세이는 탐지감도가 낮고 데이터의 해석이 불분명하여 신뢰성이 낮다는 단점이 있다. 또한, 상품화되어 있는 하이브리드 캡처 키트(Hybrid Capture kit, Digene Diagnostics, MD, USA, www. digene. com)는 HPV DNA를 시료로부터 쉽게 분리하여 PCR 증폭과정 없이 검색할 수 있으나, 해당 HPV DNA가 고위험군(highrisk group)에 속하는지 저위험군(low risk group)에 속하는지만을 알 수 있을 뿐 정확한 유전형 판별이 불가능하므로, 고위험군중에서도 암발생률과 상관관계가 매우 높은 타입을 다른 고위험군(중위험군(intermediate group)이라고 할 수 있음)과 구별할 수 없고, RNA 프로브를 이용하므로 안정성이 낮고 오염가능성을 배제할 수 없는 문제점이 있다.

따라서, HPV의 감염여부와 감염된 HPV의 유전형을 간단하고, 정확하게 진단할 수 있을 뿐만 아니라 높은 특이도와 민감도를 갖는 HPV의 진단 방법 및 키트, 이에 사용되는 프로브 및 DNA 칩을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다. 또한, 상기 진단키트, 이에 사용되는 프로브 및 DNA 칩은 가능한 여러 가지 유형의 HPV를 높은 특이도 및 민감도로 분석하여 HPV 감염여부와 유전형을 더욱 정확하게 진단할 수 있어야 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 여러 가지 유형의 HPV를 높은 특이도 및 민감도로 HPV 감염여부와 유전형을 더욱 정확하게 진단하기 위해서, 본 발명은 HPV의 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합할 수 있는 신규한 프로브를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 HPV의 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합할 수 있는 신규한 프로브를 포함하는 HPV의 감염 및 유전형 분석을 위한 DNA 칩을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 상기 HPV의 감염 및 유전형 분석을 위한 신규한 DNA 칩을 포함하는 HPV 유전형 분석키트를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인유두종 바이러스(humanpapillomavirus, HPV)의 DNA와 상보적으로 결합할 수 있는 유전형 분석 DNA 프로브 및 상기 프로브를 포함하는 HPV 감염을 진단하기 위한 DNA 칩 및 유전형 분석키트를 제공한다.

본 발명자들은 간단한 방법으로 환자의 유전형을 분석하여 인유두종 바이러스(HPV)의 감염여부를 진단하고, 감염된 HPV의 종류를 정확하게 판별할 수 있는 방법을 확립하고자 연구노력한 결과, HPV의 DNA와 상보적으로 결합할 수 있는 프로브, 및 이를 포함하는 DNA 칩을 개발하였다. 본 발명은 HPV DNA의 염기서열, 바람직하게는 HPV의 L1 DNA와 상보적으로 결합하는 염기서열을 프로브를 제공한다. 본 발명의 프로브는 서열목록 서열번호 1 내지 27에 기재된 염기서열을 포함한다(표 1a).

[표 1a]

SEQ ID NO.	HPV 유형	서열	modification
1	6	ATGTGCATCCGTAACACATCTTCCACAT	5'- amine
2	6	CGTAACACATCTTCCACATACACCAATTCT	5'- amine
3	11	GTGTCTAAATCTGCTACATACACTAATTCA	5'- amine
4	11	ACTATGTGCATCTGTGTCTAAATCTGCTAC	5'- amine
5	18	CAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCT	5'- amine
6	18	CTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATG	5'- amine

7	31	CTGCTGCAATTGCAAACAGTGATACTACATT	5'- amine
8	31	TGTGCTGCAATTGCAAACAGTGATACTACA	5'- amine
9	33	TATGACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGA	5'- amine
10	33	TGACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGACA	5'- amine
11	39	CTTTACATTATCTACCTCTATAGAGTCTTC	5'- amine
12	39	ATTATCTACCTCTATAGAGTCTTCCATACC	5'- amine
13	42	TGCCACTGCAACATCTGGTGATACATATAC	5'- amine
14	42	AACATCTGGTGATACATATACAGCTGCTAA	5'- amine
15	42	AACATCTGGTGATACATATACAGCTGCTAA	3'- amine
16	44	CAATATGTGCTGCCACTACACAGTCCCCTC	5'- amine
17	44	CCTCCGTCTACATATACTAGTGAACAATAT	5'- amine
18	44	TACACAGTCCCTCCGTCTACATATACTAGT	5'- amine
19	45	TGCCTCTACACAAAATCCTGTGCCAAGTAC	5'- amine
20	45	AAAATCCTGTGCCAAGTACATATGACCCTA	5'- amine
21	51	GCGGTTTCCCCAACATTTACTCCAAGTAAC	5'- amine
22	51	GCGGTTTCCCCAACATTTACTCCAAGTAAC	3'- amine
23	51	GCCACTGCTGCGGTTTCCCCAACATTTACT	5'- amine
24	52	CTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAA	5'- amine
25	52	CTTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCA	5'- amine
26	59	TACTTCTTCTATTCTAATGTATACACACC	5'- amine
27	59	CATTGCTTCTACTACTTCTTCTATTCTAATG	5'- amine

[표 1b]

SEQ ID NO.	HPV 유형	서열	modification
28	6	ATCCGTAACCTACATCTTCCACATACACCAA	5'- amine
29	11	ATCTGTGTCTAAATCTGCTACATACACTAA	5'- amine
30	18	TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA	5'- amine
31	31	TGTTTGTGCTGCAATTGCAAACAGTGATAC	5'- amine
32	33	TTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTAC	5'- amine
33	39	TCTACCTCTATAGAGTCTTCCATACCTTCT	5'- amine
34	42	CTGCAACATCTGGTGATACATATACAGCTG	5'- amine
35	44	GCCACTACACAGTCCCCTCCGTCTACATAT	5'- amine
36	45	ACACAAAATCCTGTGCCAAGTACATATGAC	5'- amine
37	51	AGCACTGCCACTGCTGCGGTTTCCCCAACA	5'- amine
38	52	TGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAA	5'- amine
39	59	TCTACTACTGCTTCTATTCTAATGTATAC	5'- amine

본 발명의 프로브를 이용하여 높은 특이도와 민감도로 HPV의 감염여부 및 유 전형을 분석할 수 있으며, 특히 본 발명의 프로브는 PCT/KR/01213호(2000년 10월 26일자 출원) 및 PCT/KR01/01562(2001년 09월 18일자 출원)에 기

재된 HPV 유전형 분석용 프로브(서열번호 28 내지 39)에 비해서 그 특이도와 민감도가 훨씬 높은 것이 특징이다. 본 발명의 DNA 칩 또는 진단용 유전형 분석 키트는 서열번호 1 내지 27에 기재된 염기서열을 갖는 프로브중에서 선택된 1종 이상의 HPV 프로브를 포함할 수 있다. 본 발명의 일례에서, 상기 DNA 칩 또는 진단용 유전형 분석 키트는 본 발명의 기술분야 전문가가 용이하게 조합가능한 모든 프로브 서열 세트를 포함하는 DNA 칩도 포함되며, 다음과 같은 예를 포함한다.

예 1)

서열번호 1 내지 27에 표시된 염기서열을 및 이들에 상보적인 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 1종이상의 HPV 프로브를 포함하는 DNA 칩 또는 진단용 유전형 분석 프로브를 포함하는 DNA 칩.

예 2)

i) 서열번호 1 내지 27에 표시된 염기서열 및 이들에 상보적인 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 1종이상의 HPV 프로브, 및

ii) 서열번호 2, 3, 5, 7, 10, 11, 15, 17, 20, 22, 24 및 27에 표시된 염기서열 및 이들에 상보적인 염기서열을 갖는 프로브들로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 12종의 HPV 프로브를 포함하는 DNA 칩 또는 진단용 유전형 분석 프로브를 포함하는 DNA 칩.

예 3)

i) 서열번호 1 내지 27에 표시된 염기서열 및 이들에 상보적인 염기서열을 갖는 프로브들로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 HPV 프로브,

ii) 서열번호 2, 3, 5, 7, 10, 11, 15, 17, 20, 22, 24 및 27에 표시된 염기서열 및 이들에 상보적인 염기서열을 갖는 프로브들로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 12종의 HPV 프로브, 및

iii) 서열번호 1 내지 27에 표시된 염기서열 및 이들에 상보적인 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 염기서열의 5' 또는 3' 말단이 아민으로 변형(modification)된 HPV 프로브를 1종 이상 포함하는 DNA 칩 또는 진단용 유전형 분석 프로브를 포함하는 DNA 칩.

예 3)에서와 같이 염기서열의 5' 또는 3' 말단을 아민기로 변형시키면 DNA 칩의 민감도를 더 향상시킬 수 있다. 또한 프로브의 염기서열중 일부 또는 전체가 PNA(Peptide nucleic acid) 또는 LNA(Locked nucleic acid)로 치환된 서열을 포함할 수 있다.

상기 DNA 칩은 프로브의 위치를 알려주는 기준 마커(marker)를 추가로 포함할 수도 있다. 마커로는 β - 글로빈, 액틴, GAPDH (glyceraldehyde- 3- phosphate dehydrogenase) 유전자 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

또한 본 발명에 따라 HPV의 DNA와 상보적으로 결합가능한 염기서열을 가지는 프로브를 제공한다. 본 발명의 프로브는 HPV에 특이적으로 하이브리다이제이션되는 것이 특징이다.

한편, 전기 HPV의 유전형 분석키트에 포함된 DNA 칩의 제조방법은 HPV의 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합할 수 있는 염기서열의 5'말단 또는 3'말단에 아민이 결합된 DNA 프로브를 삭제하는 공정; 전기 삭제된 DNA 프로브를 알데히드가 결합된 고체의 표면에 결합시키는 공정; 및, 전기 DNA 프로브가 결합된 고체표면에 존재하는 아민과 결합하지 않은 알데히드를 환원시키는 공정을 포함한다.

이하, 본 발명의 DNA 칩 및 그의 제조방법을 공정별로 나누어 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

제 1공정 : 프로브의 삭제

HPV의 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합할 수 있는 염기서열의 5'또는 3'말단에 아민이 결합된 DNA 프로브를 삭제한다. 이때, 프로브는 HPV의 DNA의 염기서열, 바람직하게는 HPV의 L1 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합하는 염기서열을 갖도록 설계 및 합성되고, 합성된 염기서열이 고체의 표면에 결합될 수 있도록 염기서열의 5' 또는 3'말단에 아민기를 결합시켜서 프로브를 삭제한다.

제 2공정 : 프로브의 고정화

전기 작성된 DNA 프로브를 알데히드가 결합된 고체의 표면에 결합시킨다. 이때, 고체는 특별히 제한되는 것은 아니나, 유리인 것이 바람직하고, 고체 표면의 알데히드는 이 분야에서 알려진 방법, 즉 프로브의 5' 또는 3' 말단에 결합된 아민과 30 내지 40°C의 온도 조건 그리고 70 내지 100%의 습도조건에서 시프염기반응(Schiff's base reaction)을 수행하여 고체표면에 프로브를 결합시킨다. 이때, 프로브의 농도는 50 내지 300 pmol/l이 가능하고, 가장 바람직하게는 200 pmol/l이다. 또한 상기 고체의 표면에 전체적인 위치 마커 및 하이브리디제이션 반응에 대한 대조군 역할을 하는 β -글로빈을 부착한다.

제3공정 : DNA 칩의 제조

전기 프로브가 결합된 고체표면에 존재하는 아민과 결합하지 않은 알데히드를 환원시켜서, DNA 칩을 제조한다. 이때, 알데히드의 환원조건이 특별히 제한되는 것은 아니나, NaBH_4 등의 환원제를 사용함이 바람직하다.

또한, 본 발명은 상기 DNA 칩을 포함하는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트 및 이를 이용한 인유두종바이러스 감염의 진단방법에 관한 것이다. 본 발명은 본 발명에 따른 DNA 칩을, 시료로부터 채취한 DNA를 PCR 방법으로 증폭시키기 위한 프라이머, 및 전기 DNA칩과 하이브리디제이션되는 증폭된 DNA를 탐지하기 위한 표지수단을 포함하는 인유두종 바이러스의 유전형 분석키트에 관한 것이다.

본 발명은 또한,

- i) 상기 인유두종 바이러스의 유전형 분석키트의 프라이머, 예컨대 서열번호 40 및 41의 프라이머를 사용하여, 검사할 시료로부터 채취한 DNA를 증폭시키는 단계,
- ii) 전기 증폭된 DNA를 상기 유전형 분석키트의 DNA칩에 적용하여 증폭된 DNA와 프로브를 하이브리디제이션시키는 단계, 및
- iii) 상기 프로브와 하이브리디제이션된 DNA를 상기 HPV의 유전형 분석키트의 표지수단으로 표지하고, 이를 검출하는 단계를 포함한다.

본 발명의 일례에서, 시료 DNA의 증폭은 통상의 PCR 반응으로 수행할 수 있으며, 바람직하게는 두단계 PCR 증폭법 또는 2중 이상의 프라이머를 사용하여 동시에 증폭하는 다중 PCR 증폭법을 수행하거나, 더욱 바람직하게는 2중 이상의 프라이머를 사용하여 두단계로 증폭하는 2단계 다중 PCR 증폭을 수행할 수 있다.

또한 HPV 유전자 증폭을 위한 가장 적합한 조건을 개발한 결과, 증폭방법으로는 두단계 PCR (Two steps PCR) 또는 다중 PCR(multiplex PCR)이다.

전변성, 변성, 프라이머 결합, 및 사슬연장단계로 이루어진 PCR반응에서, 종래에는 동일한 반응조건에서 반복수행하는 한단계 PCR반응을 수행하였으나, 두단계 PCR 반응이란 다른 증폭반응, 예컨대 변성단계, 프라이머 결합단계, 또는 사슬연장단계중 하나 이상의 단계를 다른 반응조건하에서 일부 반복증폭을 수행하는 것을 말한다. 본 발명에서는 제 1 증폭단계에서는 통상의 사슬연장단계 시간에 비해서 짧게 수행하고, 제 2증폭단계에서는 제 1 단계보다 더 짧은 시간동안 수행하여, 긴 시간동안(예, 1분 내지 2분) 연장반응을 수행할 경우에 지나치게 긴 산물이 얻어지는 것을 방지하여 프로브의 특이도(specificity)를 높일 수 있어 바람직하다. 더욱 바람직하게는 PCR 증폭반응의 사슬연장반응을 제 1 단계에서는 20 ~ 30초간 실시하고, 제 2 증폭단계에서는 10 ~ 15초간 실시할 수 있다.

본 발명에서, HPV 프라이머를 사용한 시료와, 마커인 β -글로빈 시료를 별개로 증폭하여 분석할 수도 있으나, 서열번호 40과 서열번호 41의 HPV 프라이머와 서열번호 42와 서열번호 43의 β -글로빈 프라이머를 함께 사용하여 한단계 PCR 증폭을 하거나, 상기와 같이 두단계 PCR 반응을 수행할 수도 있다.

본 발명의 바람직한 일례에서, 상기 HPV 프라이머 및 β -글로빈 프라이머, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 표지물질, 그리고 Taq 폴리머라제를 포함하고, 경우에 따라 첨가물로 BSA 및 DMSO등을 사용하여 PCR 서머싸이클러에 넣고, 94°C에서 5분간 변성(denaturation)후, 94°C에서 1분간 변성(denaturation), 45 ~ 50°C에서 2분간 프라이머 결합(primer annealing), 72°C에서 20 ~ 30초간 연장(extension) 과정을 5회 반복 후 94°C에서 1분간 변성(denaturation), 45 ~ 50°C에서 2분간 프라이머 결합(primer annealing), 72°C에서 10 ~ 15초간 연장 과정을 35회 반복한 뒤 72°C에서 2분간 더 연장 반응을 하여, 표지분자가 결합된 증폭된 DNA 시료를 수득한다.

이하, 본 발명의 인유두종바이러스의 유전형 진단키트를 이용한 인유두종바이러스 감염의 진단방법을 단계별로 나누어 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

제1공정 : 시료의 수득 및 증폭

검사할 시료를 증폭시켜서 Cy5(Cyanine 5)을 포함하는 증폭시료를 수득한다: 이때, 증폭된 시료가 Cy5을 함유하기 위하여 Cy5- dUTP를 사용한 PCR을 통하여 증폭시료를 수득한다. 증폭을 위한 프라이머 4개를 다음의 표 2에 나타낸다.

[표 2]

SEQ ID NO.	HPV 유형	서열	염기수
40	Gp5d+	5'- TTTKTTACHGT KGT DGATACYAC- 3'	23
41	Gp6d+	5'- GAAAHATAAAYTGYAADTCATAYTC- 3'	25
42	BG 1	5'- ATACAAGTCAGGGCAGAG- 3'	18
43	BG 2	5'- CTAAACCTGTCTTGTAAACC- 3'	20

상기 표 2에서 R(A,g): Y(C,T): M(A,C): K(g,T): S(g,C): W(A,T), V(A,C,g): H(A,T,C): B(g,T,C): D(g,A,T): N(A,g,C,T)을 의미하며, 이는 본 기술분야의 전문가에게 널리 알려져 있다.

서열번호 40 및 41 염기서열로 구성된 HPV 증폭용 프라이머가 제공되며, 또한, 서열번호 42 및 43 염기서열로 구성된 신규한 β - 글로빈 프라이머가 제공된다.

제 2공정 : 하이브리디제이션 반응

상기 증폭시료를 DNA 칩에 적용하여, 프로브와 하이브리디제이션 반응을 수행한다.

제 3공정 : 검출

프로브와 하이브리디제이션된 DNA를 표지수단으로 표지하고, 이를 검출하여, HPV의 감염여부를 판단한다.

표지수단은 Cy5, 비오틴 결합 화합물, Cy3, EDANS(5- (2'- 아미노에틸)아미노- 1- 나프탈렌 황산), 테트라메틸로다민(TMR), 테트라메틸로다민 이소시아네이트(TMRITC), x- 로다민 또는 텍사스 레드(Texas red) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 Cy5 및 비오틴- 결합 물질이다. 표지물질의 검출수단으로 콘포칼 레이저 스캐너(confocal laser scanner)로 스캐닝하여 읽는다.

따라서, 본 발명의 DNA 칩을 이용한 HPV의 유전형 진단키트를 사용하여, 인유두종바이러스의 감염여부를 진단할 경우, 신속하고 간단하며 정확하게 HPV 감염여부 및 유전형을 검출할 수 있으므로, 자궁경부암의 조기진단, 예방 및 치료에 기여할 수 있을 것이다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 프로브의 제조

HPV를 8가지의 고위험군(HPV 타입 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 59)과 4가지의 저위험군(HPV 타입 6, 11, 42, 44)으로 분류하고, HPV 유전형 검출을 위하여 사용된 각 HPV 유전형에 특이적인 프로브와 β - 글로빈에 특이적인 프로브는 5' 말단 또는 3' 말단에 아민(amine)기가 포함되도록 작제하였다. 각 프로브의 염기서열은 표 1a 및 b와 서열목록에 나타났다.

실시예 2: DNA 칩의 제조

상기 실시예 1에서 제조된 각각의 프로브를 3X SSC(0.05 M 소듐 시트레이트, 0.45 M NaCl, pH 7.0)에 200pmol/l가 되도록 용해시키고, 알데히드가 결합된 슬라이드(silylated slide, CSS- 100, CEL, Houston, TX, USA) 표면에 어레이어(GMS 417 Arrayer, TaKaRa, Japan)를 이용하여 크기 150m, 간격 300m로 스팟팅(spotting)한 다음 37 °C, 습도 70%이상의 조건에서 4시간 동안 시프염기반응(Schiff base reaction)을 수행하였다. 이어, 0.2%(w/v) 소디

움 도데실설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS) 용액으로 슬라이드를 세척하고, 3차 증류수로 세척한 다음, NaBH₄ 용액(0.1g NaBH₄, 30ml phosphate buffered saline(PBS), 10ml ethanol)에 5분 동안 침지하여 아민이 결합되지 않은 알데히드를 환원시킨 후, 3차 증류수로 세척하고, 건조시켜서 DNA 칩을 제조하였다. 또한 상기 고체의 표면에 전체적인 위치 마커 및 하이브리다이제이션 반응에 대한 대조군 역할을 하는 β - 글로빈을 부착하였다.

실시예 3: PCR 증폭반응

시료로부터 HPV 유전자의 증폭 위해서, 다음과 같은 조건으로 수행하였다.

94°C에서 5분간 변성(denaturation)후, 94°C에서 1분간 변성(denaturation), 50°C에서 2분간 프라이머 결합(primer annealing), 72°C에서 30초간 연장(extension)과정을 5회 반복 후 94°C에서 1분간 변성, 50°C에서 2분간 프라이머 결합(primer annealing), 72°C에서 15초간 연장 과정을 35회 반복한 뒤 72°C에서 2분간 더 연장 반응을 하여, Cy5가 결합된 증폭된 DNA 시료를 수득하였다.

실시예 4: 시료의 수득

사람의 자궁경부조직(Human cervical swabs)이 HPV에 감염되었는지의 여부를 확인하기 위하여, 먼저 전기 조직에서 DNA를 추출하고, 정제하였다. 전기 정제된 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 42 및 43를 갖는 β - 글로빈 프라이머(β - globin primer)를 이용하여 PCR을 수행하며, β - 글로빈 유전자가 증폭된 DNA를 선별하여 검색시료로서 사용하였다.

또한, 플라스미드 DNA를 검색시료의 대조군으로 사용하였다. HPV 타입 6, 11, 45, 및 51 (Dr. Ethel- Michele de Villiers, Angewandte Tumorstudiologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 242, 69009 Heidelberg, Germany); HPV 타입 44 (Dr. Attila L. Rincz, Vice President, Ramp;D and Scientific Director, Digena Diagnostics, Inc., 2301- B Broadburch Drive, Silver Spring, MD 20904, USA); 타입 42, 및 59 (Dr. Toshihiko Matsukura, Department of Pathology and Laboratory of Pathology, AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162, Japan); 및, 타입 33, 39, 및 52 (Dr. Gerard Orth, Unit Mixte Institut Pasteur/INSERM (U.190), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)의 플라스미드 DNA를 검색시료로서 사용하였다.

아울러, 대한민국 서울시 종로구 연건동 28번지에 소재하는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입한 SiHa 세포주(HPV16, KCLB 30035, Human squamous carcinoma, cervix) 에서 추출 및 정제된 DNA를 양성 대조군 또는 실험군으로 사용하였다.

전기 선별된 DNA를 주형으로 사용하고, 서열번호 40 및 서열번호 41의 염기서열을 프라이머로 사용하여 PCR를 수행하여 증폭된 시료를 수득하였다.

4- 1: 양성대조군 시료의 수득

전기 정제된 HPV16과 HPV18의 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 40 및 서열번호 41를 프라이머로 사용하여 다음과 같이 PCR 를 수행하였다: 1 x PCR 완충용액(50mM KCl, 4mM MgCl₂, 10mM Tris- HCl, pH 8.3), 0.1 μg의 DNA, 4 mM MgCl₂, 각 25 pmol의 프라이머, 40μ M의 각 dATP, dCTP, dGTP(Pharmacia), 30μ M의 dTTP(Pharmacia), 0.05 nM의 Cy5- dUTP(NEN, USA) 및 2 유닛 Taq 폴리머라제(TaKaRa, Japan)를 포함하는 50 μl의 반응 혼합물을 PCR 서머싸이클러(thermocycler, Perkin- Elmer Cetus, CA, USA)에 넣고, 94°C에서 5분간 변성(denaturation)후, 94°C에서 1분간 변성(denaturation), 50°C에서 2분간 프라이머 결합(primer annealing), 72°C에서 30초간 연장(extension)과정을 5회 반복 후 94°C에서 1분간 변성(denaturation), 50°C에서 2분간 프라이머 결합(primer annealing), 72°C에서 15초간 연장(extension)과정을 35회 반복한 뒤 72°C에서 2분간 더 연장 반응을 하여, Cy5가 결합된 증폭된 DNA 시료를 수득하였다.

4- 2: HPV 시료의 수득

전기 수득한 각종 HPV의 플라스미드 DNA를 주형으로 하는 것을 제외하고는, 실시예 4- 1과 동일한 방법으로 Cy5가 결합된 증폭된 DNA 시료를 수득하였다.

4- 3: 검사 시료의 수득

전기 수득한 자궁경부조직의 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 40 및 41를 갖는 염기서열을 프라이머로 사용하며, 실시예 4- 1과 동일한 방법으로 Cy5가 결합된 증폭된 DNA 시료를 수득하였다.

실시에 5: DNA 칩을 사용한 감염여부의 확인

전기 실시예 2에서 제조한 DNA 칩에 실시예 4에서 수득한 증폭된 시료를 적용하여, 하이브리다이제이션 반응을 다음과 같이 수행하였다. 이때, 하이브리다이제이션 반응실(Hybridization reaction chamber)로 100 μ l 용량의 커버슬립(cover slip, GRACE Bio- Labs, USA, PC4L- 1.0)을 사용하였다.

양성 대조군과 플라스미드 DNA의 경우는 10 μ l의 증폭산물, 자궁경부조직의 DNA의 경우는 HPV 증폭산물 10 μ l와 β - 글로빈 증폭산물 5 μ l의 혼합물을 반응시료로서 사용하였다. 전기 반응시료에 3N 수산화나트륨(NaOH) 수용액을 10%(v/v) 첨가하여 실온에서 5분간 변성시키고, 1M Tris-HCl(pH 7.2)을 5%(v/v) 첨가하여 중화시켰다. 그런 후에, 상기 결과물에 3N 염산을 10%(v/v) 첨가한 후, 얼음에서 5분간 방치하였다. 이어서, 하이브리다이제이션 용액(6X 식염수- 소듐염 포스페이트- EDTA 완충액(SSPE, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 0.2% 소듐염 도데실 설페이트(SDS))를 사용하여 40 °C에서 실릴화된 슬라이드(silylated slide)에 고정된 프로브와 2시간 동안 반응시키고, 3X SSPE로 2분, 1X SSPE로 2분간 DNA 칩을 세척하여 실온에서 공기 건조하거나 스핀 건조기(spin dryer)를 사용하여 건조하였다.

이를 콘포칼 레이저 스캐너(confocal laser scanner, GSI Lumonics, Germany)를 이용하여 형광신호를 분석하였다(excitation 650 nm, emission 668 nm)(도 1, 도 2a 내지 도 2i)

비교예 1: 프로브 테스트

도 1에 나타난 바와 같이, HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 및 59에 대한 기존 프로브(서열번호 28 내지 39)와 본 발명의 프로브(서열번호 1 내지 27)의 프로브의 효과를 확인하기 위한 DNA칩을 나타낸다. 상기 DNA 칩을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1 내지 5와 동일하게 수행하였다. 또한 형광신호를 분석을 위해 quanarray (GSI Lumonics, Germany)를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 측정하여 분석하였다 (표 3 내지 14).

도 2a 내지 도 2i에서 각 타입에 대한 대조군 DNA로 분석한 결과, 기출원된 프로브의 저민감도를 확인하였다.

하기 표 3은 HPV type 6을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 3]

Probe name	Type 6 (SEQ ID NO 28)	Type 6- 1 (SEQ ID NO 1)	Type 6- 2 (SEQ ID NO 2)
Signal to noise	12.23	4.24	15.12

도 2a의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 1, 2 및 28의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 2가 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

하기 표 4은 HPV type 11을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 4]

Probe name	Type 11 (SEQ ID NO 29)	Type 11- 1 (SEQ ID NO 3)	Type 11- 2 (SEQ ID NO 4)
Signal to noise	10.67	12.32	3.24

도 2b의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석

한 것이다. SEQ ID NO 3, 4 및 29의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 3가 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

하기 표 5는 HPV type 18을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 5]

Probe name	Type 18 (SEQ ID NO 30)	Type 18- 1 (SEQ ID NO 5)	Type 18- 2 (SEQ ID NO 6)
Signal to noise	7.25	13.54	8.16

도 2c의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 5, 6 및 30의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 5가 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

하기 표 6은 HPV type 31을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 6]

Probe name	Type 31 (SEQ ID NO 31)	Type 31- 1 (SEQ ID NO 7)	Type 31- 2 (SEQ ID NO 8)
Signal to noise	2.5	3.71	3.28

도 2d의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 7, 8 및 31의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 7이 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

하기 표 7은 HPV type 33을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 7]

Probe name	Type 33 (SEQ ID NO 32)	Type 33- 1 (SEQ ID NO 9)	Type 33- 2 (SEQ ID NO 10)
Signal to noise	2.75	2.94	3.24

도 2e의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 9, 10 및 32의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 10가 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

하기 표 8은 HPV type 39을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 8]

Probe name	Type 39 (SEQ ID NO 33)	Type 39- 1 (SEQ ID NO 11)	Type 39- 2 (SEQ ID NO 12)
Signal to noise	3.52	3.86	3.24

도 2f의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 11, 12 및 33의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 11가 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

하기 표 9는 HPV type 42을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 9]

Probe name	Type 42 (SEQ ID NO 34)	Type 42- 1 (SEQ ID NO 13)	Type 42- 2 (SEQ ID NO 14)	Type 42- 3 (SEQ ID NO 15)
Signal to noise	2.68	2.74	2.7	3.3

도 2g의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 13, 14, 15 및 34의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 15가 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

하기 표 10은 HPV type 44를 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 10]

Probe name	Type 44 (SEQ ID NO 35)	Type 44- 1 (SEQ ID NO 16)	Type 44- 2 (SEQ ID NO 17)	Type 44- 3 (SEQ ID NO 18)
Signal to noise	7.02	3.62	11.37	7.44

도 2h의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 16, 17, 18 및 35의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 17가 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

상기 표 11은 HPV type 45을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 11]

Probe name	Type 45 (SEQ ID NO 36)	Type 45- 1 (SEQ ID NO 19)	Type 45- 2 (SEQ ID NO 20)
Signal to noise	6.85	6.36	8.85

도 2i의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 19, 20 및 36의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 20가 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

하기 표 12은 HPV type 51을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 12]

Probe name	Type 51 (SEQ ID NO 37)	Type 51- 1 (SEQ ID NO 21)	Type 51- 2 (SEQ ID NO 22)	Type 51- 3 (SEQ ID NO 23)
Signal to noise	6.54	6.32	11.03	6.14

도 2j의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 21, 22, 23 및 37의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 22가 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

하기 표 13은 HPV type 52을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 13]

Probe name	Type 52 (SEQ ID NO 38)	Type 52- 1 (SEQ ID NO 24)	Type 52- 2 (SEQ ID NO 25)
Signal to noise	18.68	20.24	18.02

도 2k의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 24, 23 및 38의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 24가 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

하기 표 14은 HPV type 59을 분석하기 위한 프로브의 민감도 정도의 분석이다.

[표 14]

Probe name	Type 59 (SEQ ID NO 39)	Type 59- 1 (SEQ ID NO 26)	Type 59- 2 (SEQ ID NO 27)
Signal to noise	2.63	2.8	3.28

도 2l의 결과를 Quanarray (GSI Lumonics, Germany) 소프트웨어를 이용하여 프로브간의 형광신호의 강도를 분석한 것이다. SEQ ID NO 26, 27 및 39의 프로브의 민감도를 비교하였을 때 SEQ ID NO 27이 가장 바람직한 민감도를 보여주고 있다.

따라서 상기 표 3 내지 14에서 나타난 바와 같이, 서열번호 1 내지 39 중 서열번호 2, 3, 5, 7, 10, 11, 15, 17, 20, 22, 24 및 27이 가장 바람직하게 상대적 특이도 및 민감도가 우월하다는 것을 볼 수 있었다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 인유두종 바이러스(HPV)에 감염된 환자의 바이러스의 유전형을 분석하는 상기 고민감도 프로브 (SEQ ID NO 1~27)를 제공한다.

본 발명의 유전형 분석용 프로브는 민감하게 HPV감염여부를 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 감염된 HPV의 유전형을 판별할 수 있으므로, 자궁경부암의 조기진단, 예방 및 치료에 기여할 수 있을 것이다.

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구범위와 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1 내지 27에 표시된 염기서열 및 이들 염기서열에 상보적인 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되며, 인유두종 바이러스(HPV)의 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합하는 프로브.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드의 5' 또는 3' 말단이 아민기로 변형된, 프로브.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 프로브의 염기서열중 일부 또는 전체가 PNA(Peptide nucleic acid) 또는 LNA(Locked nucleic acid)로 치환된 서열을 포함하는, 프로브.

청구항 4.

제 1 항에 따른 프로브를 포함하는, HPV의 유전형 분석용 DNA 칩.

청구항 5.

제 4 항에 있어서,

상기 DNA 칩은 서열번호 2, 3, 5, 7, 10, 11, 15, 17, 20, 22, 24 및 27로 표시된 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드 및 이들에 상보적인 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 프로브를 포함하는 DNA 칩.

청구항 6.

제 4 항 또는 제 5 항에 따른 HPV의 유전형 분석용 DNA 칩,

시료 DNA를 PCR 방법으로 증폭시키기 위한 프라이머, 및

상기 DNA 칩과 하이브리다이제이션되는 증폭된 DNA를 탐지하기 위한 표지수단을 포함하는 HPV의 유전형 분석키트.

청구항 7.

제 6 항에 있어서,

상기 DNA 칩은 프로브의 위치를 알려주는 기준 마커를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 유전형 분석키트.

청구항 8.

제 7 항에 있어서,

상기 기준 마커가 β - 글로빈, 액틴, 및 글리세르알데히드-3- 포스페이트 데하이드로게나제(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 유전형 분석키트.

청구항 9.

제 6 항에 있어서,

상기 표지수단은 Cy5, Cy3, 비오틴- 결합물질, EDANS(5- (2'- 아미노에틸)아미노- 1- 나프탈렌 황산), 테트라메틸로 다민(TMR), 테트라메틸로다민 이소시아네이트(TMRITC), x- 로다민 및 텍사스 레드로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 유전형 분석키트.

청구항 10.

제 6 항에 있어서,

상기 시료 DNA의 PCR 증폭이, 사슬연장단계가 제 1 증폭단계에서는 20- 30초간, 제 2 증폭단계에서는 10- 15초간 수행되는 두단계 PCR 증폭인, 유전형 분석키트.

청구항 11.

제 6 항에 있어서,

상기 HPV 증폭용 프라이머와 β - 글로빈 증폭용 프라이머를 동시에 첨가하여 상기 시료 DNA를 PCR 증폭하는 것인, 유전형 분석키트.

청구항 12.

제 6 항에 있어서,

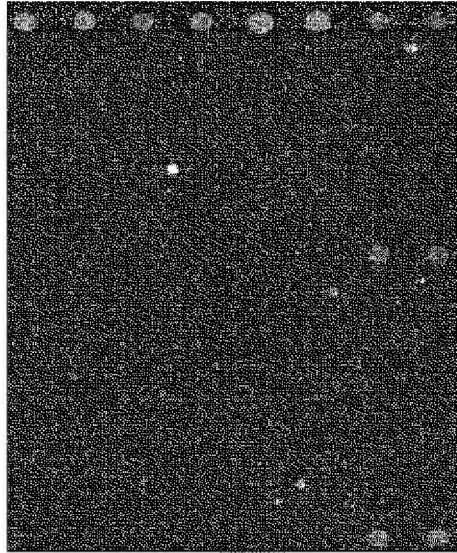
상기 프라이머가 서열번호 40 또는 41에 나타난 염기서열을 갖는 HPV 증폭용 프라이머 또는 서열번호 42 또는 43 에 나타난 염기서열을 갖는 β - 글로빈의 증폭용 프라이머인 유전형 분석키트.

도면

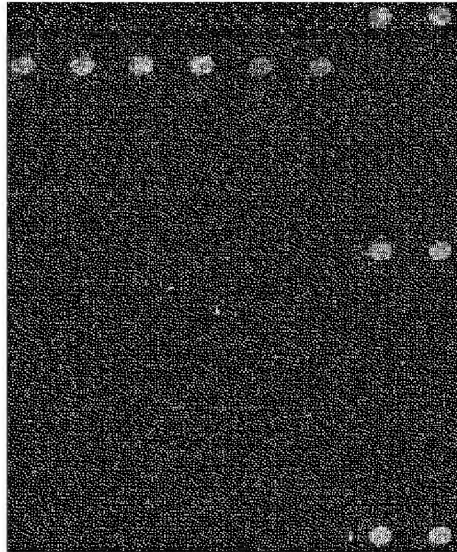
도면1

Type 6	Type 6	Type 6-1	Type 6-1	Type 6-2	Type 6-2	BG	BG
Type 11	Type 11	Type 11-1	Type 11-1	Type 11-2	Type 11-2		
Type 18	Type 18	Type 18-1	Type 18-1	Type 18-2	Type 18-2		
Type 31	Type 31	Type 31-1	Type 31-1	Type 31-2	Type 31-2		
Type 33	Type 33	Type 33-1	Type 33-1	Type 33-2	Type 33-2		
Type 39	Type 39	Type 39-1	Type 39-1	Type 39-2	Type 39-2	BG	BG
Type 42	Type 42	Type 42-1	Type 42-1	Type 42-2	Type 42-2	Type 42-3	Type 42-3
Type 44	Type 44	Type 44-1	Type 44-1	Type 44-2	Type 44-2	Type 44-3	Type 44-3
Type 45	Type 45	Type 45-1	Type 45-1	Type 45-2	Type 45-2		
Type 51	Type 51	Type 51-1	Type 51-1	Type 51-2	Type 51-2	Type 51-3	Type 51-3
Type 52	Type 52	Type 52-1	Type 52-1	Type 52-2	Type 52-2		
Type 59	Type 59	Type 59-1	Type 59-1	Type 59-2	Type 59-2	BG	BG

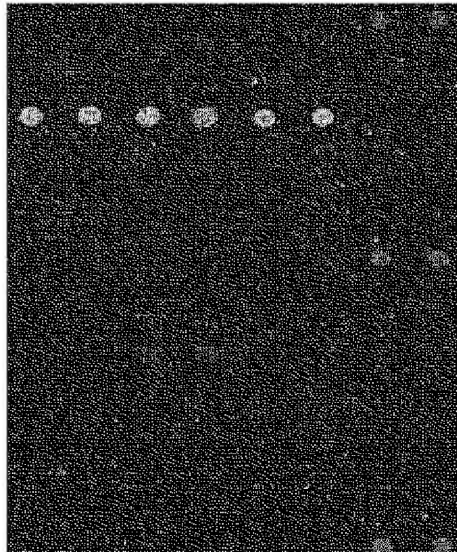
도면2a



도면2b



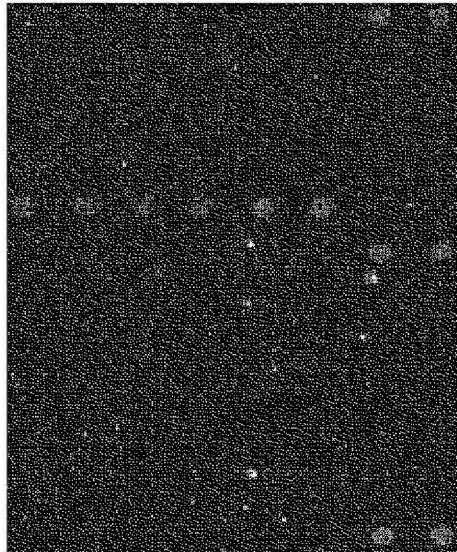
도면2c



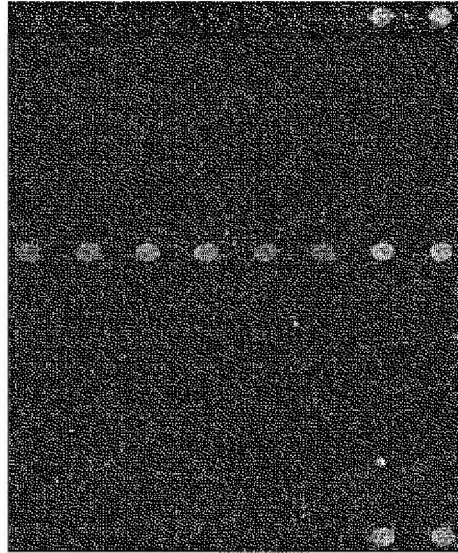
도면2d



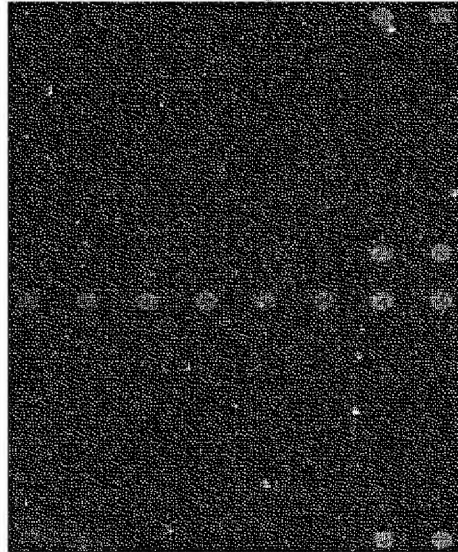
도면2e



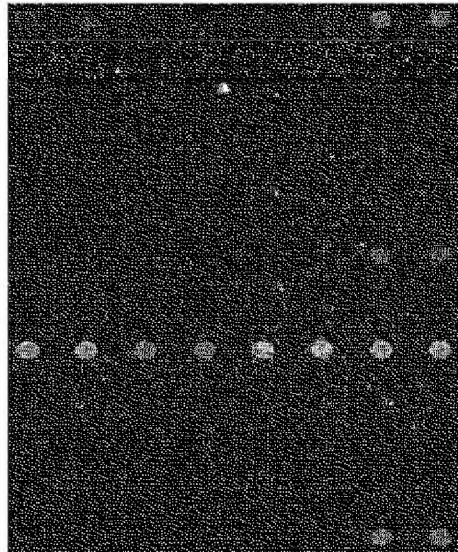
도면2f



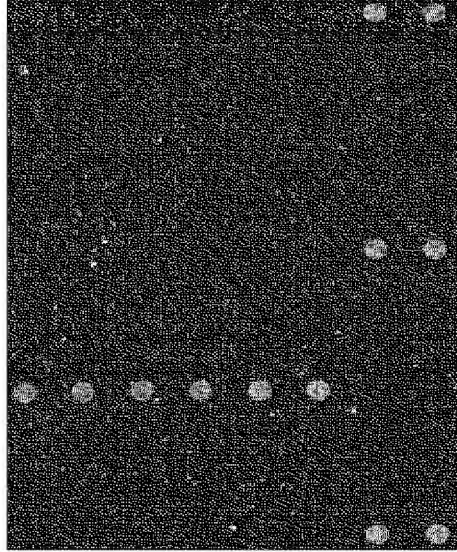
도면2g



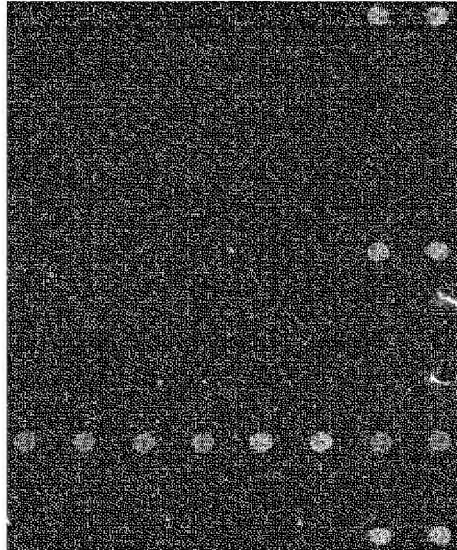
도면2h



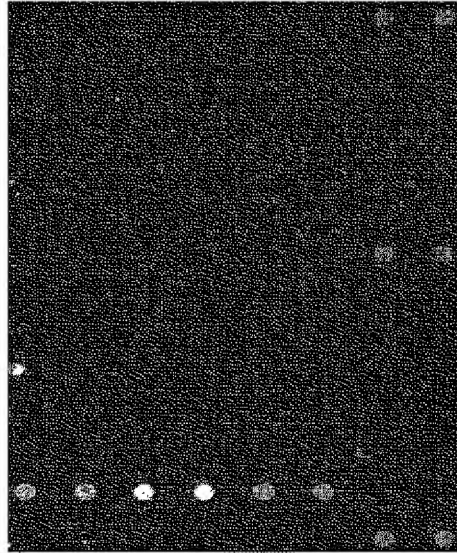
도면2i



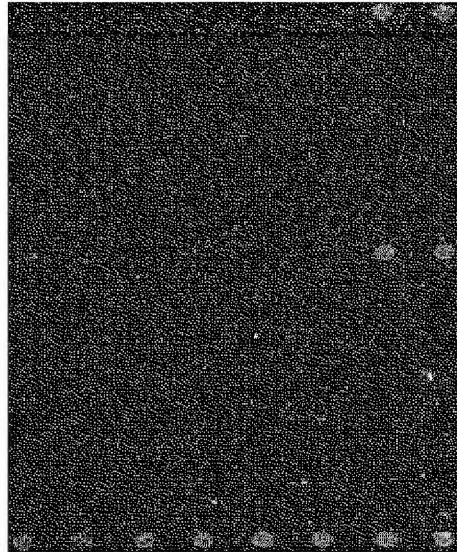
도면2j



도면2k



도면2l



- <110> BIOMECLAB
- <120> Genotyping probe for diagnosis of human papilloma virus infection
and biochip comprising the same
- <130> DPP20030375KR
- <160> 43
- <170> Kopat ent l n 1. 71
- <210> 1
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>

<223> probe HPV 6
 <400> 1
 at gt gcat cc gt aact acat ctt ccacat 29
 <210> 2
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 6
 <400> 2
 cgt aact aca tcttccacat acaccaattc t 31
 <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 11
 <400> 3
 gt gt ct aaat ct gct acat a cact aat t ca 30
 <210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 11
 <400> 4
 act at gt gca t ct gt gt ct a aat ct gct ac 30
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 18
 <400> 5

cagt ct cct g t acct gggca at at gat gct	30
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe HPV 18	
<400> 6	
ct acacagt c t cct gt acct gggcaat at g	30
<210> 7	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe HPV 31	
<400> 7	
ct gct gcaat t gcaaacagt gat act acat t	31
<210> 8	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe HPV 31	
<400> 8	
t gt gct gcaa t t gcaaacag t gat act aca	30
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe HPV 33	
<400> 9	
t at gact t t a t gcacacaag t aact agt ga	30
<210> 10	

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 33
 <400> 10
 t g a c t t t a t g c a c a c a a g t a a c t a g t g a c a 30
 <210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 39
 <400> 11
 c t t a c a t t a t c t a c c t c t a t a g a g t c t t c 30
 <210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 39
 <400> 12
 a t t a t c t a c c t c t a t a g a g t c t t c c a t a c c 30
 <210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 42
 <400> 13
 t g c c a c t g c a a c a t c t g g t g a t a c a t a t a c 30
 <210> 14
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 42

<400> 14

aacat ct ggt gat acat at a cagct gct aa

30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 42

<400> 15

aacat ct ggt gat acat at a cagct gct aa

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 44

<400> 16

caat at gt gc t gccact aca cagt ccct c

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 44

<400> 17

cct ccgt ct a cat at act ag t gaacaat at

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 44
 <400> 18
 t acacagt cc ct ccgt ct ac at at act agt 30
 <210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 45
 <400> 19
 t gcct ct aca caaaat cct g t gccaaagt ac 30
 <210> 20
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 45
 <400> 20
 aaaat cct gt gccaaagt aca t at gaccct a 30
 <210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 51
 <400> 21
 gcggtttccc caacattt ac tccaagt aac 30
 <210> 22
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 51
 <400> 22

gcggtttccc caacatttac tccaagtaac 30

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 51

<400> 23

gccactgctg cggtttcccc aacatttact 30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 52

<400> 24

ct gaggttaa aaaggaaagc acatataaaa 30

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 52

<400> 25

ctttatgtgc tgaggttaa aaggaaagca 30

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 59

<400> 26

tacttcttct attcctaatg tat acacacc 30

<210> 27

<211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 59
 <400> 27
 cat t g c t t c t a c t a c t t c t t c t a t t c c t a a t g 32
 <210> 28
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 6
 <400> 28
 a t c c g t a a c t a c a t c t t c c a c a t a c a c c a a 30
 <210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 11
 <400> 29
 a t c t g t g t c t a a a t c t g c t a c a t a c a c t a a 30
 <210> 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 18
 <400> 30
 t g c t t c t a c a c a g t c t c c t g t a c c t g g g c a 30
 <210> 31
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 31

<400> 31

tgtttgtgct gcaattgcaa acagt gat ac

30

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 33

<400> 32

tttatgcaca caagt aact a gt gacagt ac

30

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 39

<400> 33

tctacctcta tagagctctc cat accttct

30

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 42

<400> 34

ctgcaacatc tggatgacat atacagctg

30

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe HPV 44
 <400> 35
 gccact acac agt cccct cc gt ct acat at 30
 <210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 45
 <400> 36
 acacaaaat c ct gt gccaaag t acat at gac 30
 <210> 37
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 51
 <400> 37
 agcact gcc a ct gct gcggt tt cccaaca 30
 <210> 38
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 52
 <400> 38
 t gct gaggt t aaaaaggaaa gcacat at aa 30
 <210> 39
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe HPV 59
 <400> 39

t ct act act g ct t ct at t cc t aat gt at ac	30
<210> 40	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer Gp5d+	
<400> 40	
t t t k t t a c h g t k g t d g a t a c y a c	23
<210> 41	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer Gp6d+	
<400> 41	
g a a a h a t a a a y t g y a a d t c a t a y t c	25
<210> 42	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer BG1	
<400> 42	
a t a c a a g t c a g g g c a g a g	18
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer BG2	
<400> 43	
c t t a a c c t g t c t t g t a a c c	20